

УДК 575.113.2:664.71.11

ОРИГИНАЛЬНАЯ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ПО АЛЛЕЛЯМ ЛОКУСОВ *GLU* ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ ПШЕНИЦЫ НА КАЧЕСТВО ЗЕРНА

*В.В. Моргун, *О.И. Тарасюк, *В.М. Починок, * **А.И. Рыбалка

**Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, Киев, Украина*

***Селекционно-генетический институт – Национальный центр семеноводства и сортоизучения НААН Украины, Одесса, Украина*

e-mail: oksi_ti@mail.ru

Введение

Без преувеличения пшеницу можно считать стратегической зерновой культурой с точки зрения ее пищевого значения и использования [1]. Она занимает главное место среди продовольственного зерна на рынке Украины. Актуальными проблемами современной генетики и селекции пшеницы остаются качество ее зерна, хлебопекарные свойства муки, связь между содержанием белка и показателями урожайности.

Одним из главных направлений в селекции зерновых культур является улучшение качества зерна. Последнее относится к наиболее сложным генетически обусловленным признакам, которые изучаются учеными многих стран мира и Украины [2–13]. Оно определяется многими генами и их аллелями, контролирующими биосинтез конкретных клейковинных и других белков зерна. Запасные белки - глюteniны и глиадины - доминирующие белки эндосперма зерновки пшеницы, которые несут основную функциональную нагрузку относительно их влияния на качество клейковины и составляют около 80-85% от общего содержания белка в зерне [4]. Согласно международной номенклатуре, генный локус, который отвечает за биосинтез высокомолекулярных глютеинов (ВМ) *Glu-1* расположен в хромосомах гомеологической группы 1. Гены *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1*, которые контролируют фракцию ВМ глютеинов, локализованные в хромосомах гомеологической группы 1 на длинных плечах 1А1, 1В1 и 1Д1.

В настоящее время в мировой селекции наблюдается глобальная тенденция к обеднению генетического разнообразия селекционного материала пшеницы, и заостряется вопрос его обогащения. Благодаря возможностям современных генетических и генно-инженерных технологий дикие сородичи *Ae. cylindrica* и *Ae. tauschii*, доноры генома D, рассматриваются как перспективные источники обогащения культурной пшеницы селекционно-ценными признаками [13, 14]. Генетическое разнообразие клейковинных белков зерна у диких сородичей мягкой пшеницы намного больше, чем у всего существующего сегодня мирового ассортимента культуры. Это открывает широкие перспективы и возможности для современной генетики и селекции в улучшении качества пшеницы [14].

Сильное влияние на качество муки пшеницы имеют аллели локуса *Glu-D1*. За ним следуют аллели локусов *Glu-B1* и *Glu-A1* [15]. Аллельные варианты ВМ глютеинов 1А1, 1А2*, 1В 7+8, 1В 77+8, 1Д 5 +10 определяют высокие показатели качества зерна и хлебопекарных свойств пшеницы [16]. Интересным, для изучения влияния высокомолекулярных глютеинов на хлебопекарные свойства муки, является аллель *Glu-B1a1*, продуктом экспрессии которого являются две субъединицы Vx7^{OE} + Vy8*. Первая из них (Vx7^{OE}) имеет повышенный уровень экспрессии по сравнению с субъединицей с обычным ее уровнем (Vx7). Сорта с геном *Glu-B1a1* имеют высокий селекционный потенциал и могут быть донорами ценных хозяйственных признаков. [4].

Целью нашей работы было создание новых уникальных селекционных линий озимой мягкой пшеницы, которые содержат редкие глютеиновые аллели (*Glu*-аллели), а также исследование технологических и хлебопекарных свойств их муки.

Методы исследований

Отдаленная гибридизация. Для получения нового селекционного материала были проведены многочисленные скрещивания между высококачественными сортами пшеницы, созданными в Институте физиологии растений и генетики НАН Украины, Селекционно-генетическом институте (г. Одесса) и эгилопсами - *Ae. cylindrica* и *Ae. tauschii*. Исследования проводились на полях Опытного сельскохозяйственного производства Института физиологии растений и генетики НАН Украины (пгт. Глеваха, Васильковского района Киевской области). Как стандарт были взяты сорта Куяльник и Ятрань 60.

Определение количества белка и клейковины. Содержание белка и клейковины зерна исследуемых линий определяли в шроте, полученном на мельнице Perten 3100. Другие лабораторные анализы выполнялись с использованием муки 70%-го выхода, которую получали из зерна на мельнице CD-1. Показатели содержания белка и клейковины определяли на приборе Inframatic 8600. Измерения осуществлялись при температуре окружающей среды 25°C. Для анализа использовали навески шрота массой 50 г.

Мини-SDS-электрофорез в полиакриламидном геле. Для проведения анализа электрофоретического спектра запасных белков отбирали по 10 зерновок каждого исследуемого образца. Электрофоретическое разделение ВМ глютеинов зерна пшеницы в полиакриламидном геле (ПААГ) осуществляли по модифицированной методике А. И. Рыбаки мини-СДС-электрофорез, который выполняется в щелочной среде и в присутствии двух диссоциирующих агентов - додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГ = SDS-PAGE) и 2-меркаптоэтанола. ПААГ для разделения и концентрации полипептидов глютеина имели следующий состав (на 2 пластины): буфер Трис HCl 7,95, H₂O, AA + МБА. Катализаторы: SDS 10, ПСА 10% (персульфат аммония), ТЕМЕД. Электродный буфер содержал в своем составе глицин, SDS 10% и трис-гидрометиламинометан. Покраску гелевых пластин проводили в Coomassie R-250 с добавлением этилового спирта, ледяной уксусной кислоты и ТХУ. Субъединицы ВМ глютеинов и координирующие их локусы идентифицировали с использованием каталога и номенклатуры Пейна [10].

Определение физических свойств теста. Для определения физических свойств пшеничного теста использовали прибор - Альвео-консистограф фирмы Chopin. Измерение происходит благодаря сопротивлению блинчика теста нагнетательному воздуху, при растяжении его в пузырь до разрыва. С данных альвеограммы получают значение растяжимости (L) и упругости (P) теста, силы муки (W) и отношение упругости теста к его растяжимости (P/L). Последний показатель (P/L) характеризует меру сбалансированности между собой этих основных физических свойств.

Лабораторная выпечка хлеба. Лабораторную выпечку хлеба из пшеничной муки проводили безопарным методом. Для замеса теста использовали 100 г пшеничной муки 70 %-ного выхода (при влажности 14%), прессованные хлебопекарные дрожжи, соль (экстра), сахар, бромат калия, аскорбиновую кислоту, водопроводную воду по расчету в соответствии с ВПС муки по фаринографу при консистенции теста 500 е. ф. Выпекали хлеб в течении 25 мин. при температуре 230°C. Общая продолжительность процесса от начала замеса теста до конца выпечки становила 3,5-4,5 ч.

Результаты и обсуждение

Проведение электрофоретического анализа запасных белков в зерне исследуемых линий и определение в них уникальных глютеиновых аллелей, а также положительно влияющих на качественные показатели зерна пшеницы было первым этапом нашей работы.

Формулы субъединиц ВМ глютеинов исследуемых образцов определяли используя номенклатуру Пейна и Лоуренса, которые убедительно доказали существование тесной корреляционной зависимости между присутствием-отсутствием определенных аллелей *Glu-1* и показателями хлебопекарного качества.

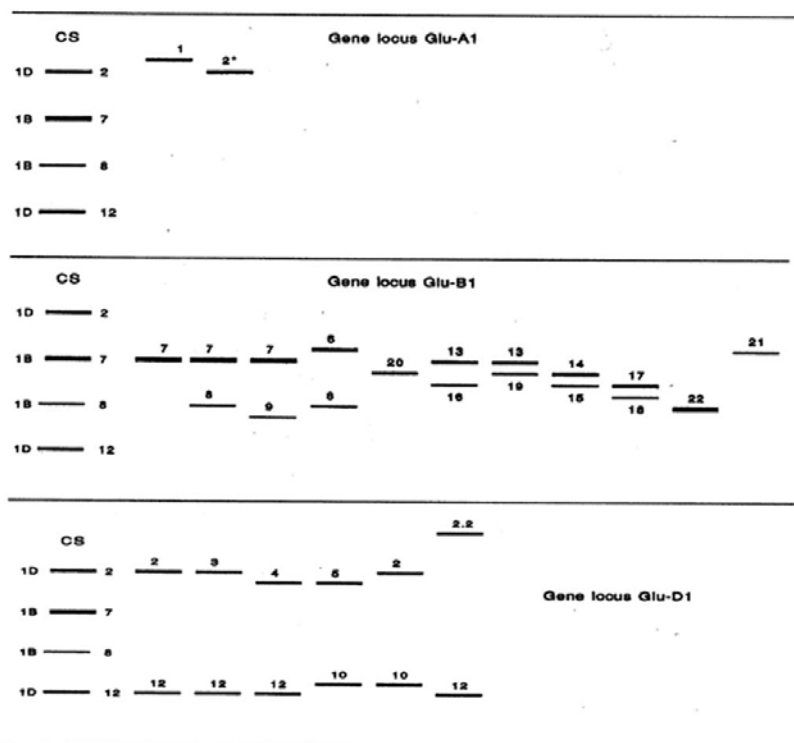


Рисунок 1 – Генетический полиморфизм высокомолекулярных глютеинов пшеницы (локус Glu-1). Слева показаны стандартные субъединицы сорта Чайнис Спринг (1AхNull, 1Bх7, 1Bх8, 1Dх2, 1Dх12) (Payne P., Lawrence G., 1983)

По формулам глютеинов $1-7+8-5+10$ (Ятрань 60) и $2^*-77+8-5+10$ (Куяльник) исследуемые сорта-стандарты имеют положительный, касательно хлебопекарного качества, состав ВМ глютеинов и относятся к сильным пшеницам (таблица 1). Линия УК 12694, содержащая гены от *Ae. tauschii*, оказалась сходной по аллельному составу *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1* с сортом Куяльник – $2^*-77+8-5+10$ (рисунок 2).

А именно, в локусе *A1* они несут вариант 2^* , который вместе с аллельным вариантом $5+10$ положительно влияет на качество зерна пшеницы. Эта линия (УК 12694), полученная от скрещивания с синтетиками, имеющими геномную формулу AABBDD, где геном DD происходит от *Ae. tauschii*, а два другие генома AABB от *T. dicoccoides*, также может содержать в своем составе аллель $77+8$. Другая линия амфилоидов – УК 12804 имела следующую формулу глютеинов – $1-77+8-5+10$ (рисунок 2). Присутствие в геноме этих линий в локусах *Glu-A1* аллеля 1 , *Glu-D1* аллеля $5+10$ также свидетельствует о положительной корреляции их с высокими хлебопекарными свойствами пшеницы (см. таблицу 1).

На рисунке 3 представлены электрофореграммы мини-SDS-электрофореза ВМ глютеинов сортов Ятрань 60, Куяльник и линий УК 12822, УК 12778 и УК 12806. Линия УК 12822, которая содержит в своем генотипе гены, интрогрессированные от *Ae. cylindrica* и имеет формулу $2^{***}-77+8-5+10$, оказалась уникальной. У нее обнаружена экстра-экспрессия 2^* , которая на электрофореграмме выражена гораздо более интенсивной полосой по сравнению с другими соответствующими субъединицами (5–9 дорожки). Кроме того, результаты мини-SDS-электрофореза запасных белков пшеницы свидетельствуют о том, что линии УК 12778 и УК 12806 несут в своем генотипе субъединицу $77+8$ аллеля *Glu-B1*, с которой связаны высокие хлебопекарные свойства муки. Аллель *Glu-B1a1* ($77+8$) возник в результате спонтанной мутации – дубликации генов одного из двух полипептидов, которые кодируются этим локусом. Формулы линий УК 12778 и УК 12806 следующие: $1-77+8-5+10$ и $2^*-77+8-5+10$.

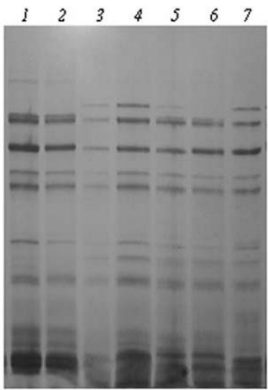


Рис. 2. Электрофореграмма мини-SDS-электрофореза ВМ глютеинов исследуемых линий: 1–2 – УК 12694, 3–4 – Ятрань 60 (стандарт), 5–6 – Куяльник (стандарт), 7 – УК 12804

Таблица 1 – Генетические формулы исследуемых сортов и линий по спектру ВМ глютеинов

Сорт, линия	Формулы ВМ глютеинов			Показатель качества
	<i>Glu A1</i>	<i>Glu B1</i>	<i>Glu D1</i>	
Ятрань 60	1	7+8	5+10	9
Куяльник	2*	77+8	5+10	10
УК 12694	2*	77+8	5+10	10
УК 12804	1	77+8	5+10	10
УК 12822	2***	77+8	5+10	10
УК 12778	1	77+8	5+10	10
УК 12806	2*	77+8	5+10	10

В таблице 1 представлены генетические формулы ВМ-глютеинов отдельных исследуемых линий и сортов-стандартов. Лocus *Glu-A1*: все образцы, за исключением линии УК 12822, которая имеет экстра-экспрессию 2*, несут аллели 1 или 2*, которые по нашим и литературным данным положительно влияют на качество зерна и зимостойкость, в сочетании с другими конкретными аллельными вариантами *Gli/Glu*-локусов. Лocus *Glu-B1*: один образец (сорт Ятрань 60) имеет аллельный вариант 7+8; все другие исследуемые линии УК 12694, УК 12804, УК 12822, УК 12778, УК 12806 несут аллель 77+8. Лocus *Glu-D1*: все исследуемые образцы озимой мягкой пшеницы несут аллель 5+10, который в сочетании с другими аллелями *A1* - 1, *A1* - 2* и *B1* - 77+8 положительно влияет на качество зерна. Самым высоким показателем качества 10 баллов характеризуются все исследованные нами селекционные линии и сорт Куяльник, опередившие сорт Ятрань 60 с баллом качества 9 (см. таблицу 1).

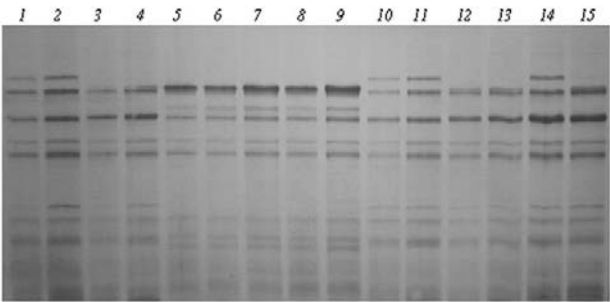


Рисунок 3 – Электрофореграмма мини-SDS-электрофореза ВМ глютеинов исследуемых линий: 1-2 – Ятрань 60 (стандарт), 3-4 – Куяльник (стандарт), 5-9 – УК 12822, 10-11 – Ятрань 60 (стандарт), 12-13 – Куяльник (стандарт), 14 – УК 12778, 15 – УК 12806

Для детального анализа селекционного материала по его технологическим показателям и хлебопекарным свойствам муки было взято 14 образцов (таблица 2). С учетом результатов анализа технологичных показателей данная группа образцов была разбита на три группы

линий, которые отличались содержанием белка в зерне: низкое содержание белка (УК 12694, УК 12845, УК 12822, УК 12739, УК 12828), умеренное содержание белка (УК 12805, УК 12820, УК 12699, УК 12778, УК 12804) и высокое содержание белка (УК 12806, УК 12732, УК 12777, УК 12747) (см. рисунок 4). Рассматривая полученные результаты, следует отметить, что линия 12747 при относительно невысоких хлебопекарных свойствах имеет высокое содержание белка в зерне – 17,3%.

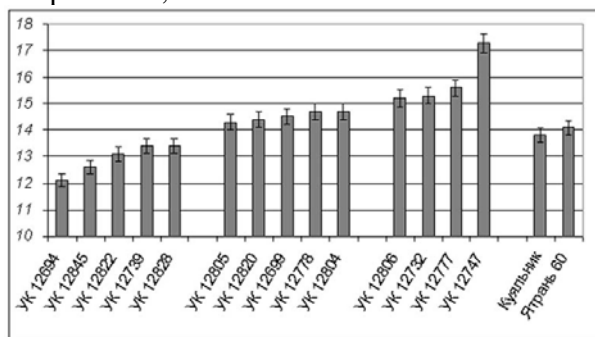


Рисунок 4 – Содержание белка в исследуемых линиях, %. Сорта Кузяльник и Ятрань 60 – стандарты

Высокая растяжимость теста важна при формировании пористого и эластичного мякиша хлеба, тогда как из теста с низкой упругостью формируется плотный мякиш с неудовлетворительной пористостью, эластичностью и низкими пищевыми характеристиками хлеба. Если говорить точнее, то для хлебовыпечки важнее не сама растяжимость или упругость теста как таковая, а скорее соотношение между упругостью теста P и его растяжимостью L (P/L).

Что касается показателя «индекс эластичности теста» (I_e), то чем он выше, тем лучше хлебопекарные свойства муки. Лучшие по качеству образцы муки могут иметь индекс эластичности от 60% до 75%. Образцы муки среднего и удовлетворительного качества имеют индекс I_e ниже 60%, в отдельных случаях он может достигать даже нулевого значения. При исследовании наших образцов это было подтверждено повышением хлебопекарных свойств муки новых линий при колебании I_e в пределах 60,1–73,0% (см. таблицу 2). Индекс I_e уже несколько лет считается дополнительным к силе муки показателем качества теста.

Линии, полученные от скрещиваний с амфиплоидом-синтетиком (УК 12804 и УК 12805), имеют высокие показатели упругости, растяжимости и эластичности теста, что в конечном результате повлияло на формирование высоких показателей силы муки, особенно у линии УК 12804 – 618 а.о. По этому показателю она опередила оба сорта-стандарта. Эта линия является ценной при селекционном улучшении показателя «сила муки», а также может использоваться как отличный улучшитель хлебопекарных свойств теста для зерна с низким хлебопекарным качеством.

Линия УК 12806, которая несет аллель *Glu-B1a1* – спонтанную мутацию типа tandemная дупликация гена на уровне транскрипции, происходящую от мексиканского сорта Ред Ривер 68, имела показатель упругости – 117 и силу муки – 489 а.о., чем превзошла аналогичные показатели сортов-стандартов. Эти данные еще раз подтверждают значительное положительное влияние аллеля *Glu-B1a1* на качество зерна пшеницы (таблица 2).

Следует отметить, что в процессе отбора селекционер может эффективно влиять на упругость теста, поскольку она имеет высокий коэффициент наследования. В то же время признак растяжимости теста имеет очень низкое наследование, а возможность влияния на него заметно ограничена. Поэтому очень высокий показатель растяжимости теста у линий УК 12820, УК 12822 (158 мм и 144 мм, соответственно) свидетельствует о хорошей перспективе данных линий как селекционного материала.

Таблица 2 – Технологические показатели качества зерна и муки линий озимой мягкой пшеницы, содержащих редкие глиадиновые и глютениновые аллели

Сорт, линия	W, а. о.	P, мм	L, мм	P/L	Индекс эластичности, %	Объем хлеба, см ³
УК 12694	394	99	103	0,97	63,0	1400
УК 12845	362	71	117	0,76	68,0	1440
УК 12822	390	72	144	0,62	65,7	1740
УК 12739	351	76	139	0,69	53,6	1560
УК 12828	374	78	105	0,89	68,7	1630
УК 12805	405	116	88	1,32	68,0	1540
УК 12820	428	72	158	0,57	66,2	1700
УК 12699	490	89	125	0,94	65,9	1520
УК 12778	364	72	88	0,80	71,3	1460
УК 12804	618	136	111	1,23	73,0	1740
УК 12806	489	117	98	1,37	68,9	1430
УК 12732	227	58	99	0,87	39,7	1280
УК 12777	285	55	134	0,40	60,1	1480
УК 12747	150	86	50	1,72	38,0	1150
Куяльник (стандарт)	434	102	104	1,25	68,7	1320
Ятрань 60 (стандарт)	472	89	161	0,67	61,0	1380

В целом, линии, генотип которых содержит перенесенный экзотический кластер *Gli-D1cyl/GluD1cyl* (УК 12820, 12822), характеризуются широким спектром хлебопекарных свойств. Вместе с этим, по показателям растяжимость теста и объем хлеба, которые составляли, соответственно, 144-158 мм и 1700-1740 см³ эти образцы опередили сорта-стандарты Ятрань 60 и Куяльник. Здесь еще раз наглядно проявилось положительное влияние генов эгилопса *Ae. tauschii* на хлебопекарные качества муки.

Выводы

Ряд исходных селекционных линий по комплексу признаков являются уникальными. Большая часть таких линий создана путем гибридизации пшеницы культурной с дикорастущими сородичами *Ae. cylindrica* и *Ae. tauschii*. Созданы гомогенные линии озимой мягкой пшеницы с высоким качеством зерна, которые содержат редкие *Gli-Glu*-аллели. В результате электрофоретического анализа исследуемых сортов и селекционных линий озимой мягкой пшеницы по трем глютениновым локусам *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1* установлено, что спектры ВМ глютенинов объективно отражают качественные показатели зерна. В результате проведенных нами исследований обнаружены уникальные по качеству зерна и хлебопекарным свойствам линии, которые являются ценным селекционным материалом. В частности, линии УК 12732, УК 12747, УК 12777 и УК 12806 имеют повышенное содержание белка в зерне; линии УК 12699, УК 12804 и УК 12806 характеризуются высокой силой муки; линии УК 12804, УК 12805 и УК 12806 имеют хорошую упругость теста; линии УК 12739, УК 12777, УК 12820 и УК 12822 – повышенную растяжимость теста; линии УК 12778, УК 12804, УК 12805, УК 12806, УК 12828 и УК 12845 – оптимальные значения индекса эластичности; линии УК 12804, УК 12805, УК 12820 и УК 12822 по объему хлеба превзошли сорта-стандарты и в целом имеют высокие хлебопекарные свойства. Эти линии могут быть использованы при создании новых экстрасильных сортов пшеницы с отличными хлебопекарными свойствами.

Список литературы

1. Моргун, В.В. Физиологические основы формирования высокой продуктивности зерновых злаков / Моргун В.В., Швартау В.В., Киризий Д.А. // Физиология и биохимия культ. растений. - 2010. – Vol. 42, № 5. - С. 371–392.
2. Попереля, Ф.А. Генетическая связь показателей качества муки мягкой пшеницы с различиями по компонентному составу глиадина, глютеина и консистенции эндосперма / Ф. А. Попереля // Науч.-техн. бюл. ВСГИ, 1986. - Вып. 61. - С. 18–23.
3. Попереля, Ф.А. Полиморфизм глиадина и его связь с качеством зерна, продуктивностью и адаптивными свойствами сортов мягкой пшеницы / Ф. А. Попереля // Селекция, семеноводство и интенсивная технология возделывания озимой пшеницы. - М.: ВО «Агропромиздат», 1988. - С. 138–150.
4. Рибалка, О.І. Якість пшениці та її поліпшення / О. І. Рибалка. – К.: Логос, 2011. – 496 с.
5. Aussenac, T. Accumulation of polymeric proteins in developing grains of hexaploid wheats in relation with changes in glutathione thiol-disulphide status / T. Aussenac, L. Rhazy // Proc. of the 10th Int. Gluten Workshop, Clermont-Ferrand, France, 2009. - Clermont-Ferrand, 2009. - P. 26–27.
6. Egidi, E. Characterization of transgenic durum wheat lines transformed with mutated m- and s-type LMW-GS. / E. Egidi, M. Janni, F. Sestili et al. // Proc. of the 10th Int. Gluten Workshop, Clermont-Ferrand, France, 2009. - Clermont-Ferrand, 2009. - P. 55–58.
7. Lawrence, G. Chromosomal location of genes controlling seed proteins in species related to wheat / G. Lawrence, K. Shepherd // Theor. Appl. Genet., 1981. – 59. – P. 25–31.
8. Majoul, T. Effect of water stress on the protein patterns of two Tunisian bread wheat cultivars differing in drought tolerance / T. Majoul, E. Bancel, E. Triboi, G. Branlard // Proc. of the 10th Int. Gluten Workshop, Clermont-Ferrand, France, 2009. - Clermont-Ferrand, 2009. - P. 68–71.
9. Moldestad, A. Effect of temperature conditions during grain development on wheat gluten resistance / A. Moldestad, E. Faergestad, B. Hoel, A. Uhlen // Ibid. - P. 42–44.
10. Lafiandra, D. Studies of High-molecular-weight glutenin subunits and their encoding genes / D. Lafiandra, R. D'Ovidio, B. Margiotta // Improvement of cereal quality by genetic engineering. – New York: Plenum Press, 1994. – P. 105–111.
11. Romeuf, I. Variations in polymorphism within genes coding for the transcriptional factor SPA might influence wheat storage proteins and quality / I. Romeuf, M. Dardevet, R. El-Malki et al. // Ibid. - P. 33–37.
12. Shewry, P. Using epitope tagging to explore the trafficking, location and functional properties of wheat gluten protein / P. Shewry, P. Tosi, D. Jones et al. // Gluten Proteins, 2006 / G.L. Lookhart, P.W. Ng eds. - 2007. - P. 112–116, AACC Int., St. Paul.
13. Сиволап, Ю.М. Молекулярно-генетический анализ интрогрессии чужеродного генетического материала в геном *T. aestivum* / Ю. М. Сиволап, С. В. Чеботарь, А. И. Рыбалка // Цитология и генетика, 1995. - 29, № 2. - С. 37–45.
14. Рыбалка, А.И. Интрогрессия генов, кодирующих биосинтез белков от отдаленных видов, в пшеницу и их влияние на качество пшеницы / А. И. Рыбалка, А. Н. Хохлов, С. В. Вовчук, О. П. Боделан // Цитология и генетика, 1993. – Т. 27. - №3. – С. 8–14.
15. Boisson, M. Partial sequences of nitrogen metabolism genes in hexaploid wheat / [M. Boisson, K. Mondon, V. Torney, N. Nicot et al. // Theor. Appl. Genet., 2005. – 110, № 5. – P. 932–940.
16. Панченко, І.А. Інформаційна цінність та успадкування алельних варіантів блоків високомолекулярних глютенінів в селекції озимої пшениці на якість зерна / [І.А.Панченко, З.В. Усова, Н.М. Притула, В.В. Лучной та ін.] // Селекція і насінництво. – Х., 2007. – Вип. 94. – С. 115–128.